

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Стаценко Варвары Николаевны
«Влияние генов с плейотропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у
споровых бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки)

Работа посвящена одной из центральных проблем современной генетики микроорганизмов и биотехнологии — поиску способов направленного повышения продуктивности штаммов-продуцентов биологически активных соединений. Спорообразующие бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов, обладающих антимикробной, противогрибковой, антиоксидантной и фитостимулирующей активностью, что делает их перспективной основой для биопрепаратов сельскохозяйственного и медицинского назначения. Однако продукция целевых веществ в природных штаммах часто недостаточно высока и нестабильна, поэтому поиск регуляторных мишеней, позволяющих усиливать биосинтетический потенциал, является своевременной и практически значимой задачей. В этой связи изучение генов с плейотропным эффектом представляется логичным, поскольку именно такие гены занимают ключевое положение в регуляторных сетях, а изменение их активности способно вызывать каскадные перестройки метаболизма.

Автореферат имеет стандартную структуру и достаточный объём, что позволяет получить полное представление о содержании и результатах работы. Во введении автором чётко сформулированы цель и задачи, обоснована актуальность и описаны положения, выносимые на защиту. Для достижения поставленной цели — изучения влияния генов с плейотропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у споровых бактерий — были поставлены пять логически взаимосвязанных задач.

Автор выбрал в качестве генов-мишеней *groV*, *abrV* и *ssrA*. Ген *groV* кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы, *abrV* — глобальный репрессор вторичного метаболизма, споруляции, биосинтеза антибиотиков и биоплёнкообразования, *ssrA* — регулятор углеродной катаболитной репрессии. Для изучения этих генов были отобраны штаммы из коллекции, представленной в созданной автором базе данных (35 штаммов) и включающей разные виды *Bacillus* и *Paenibacillus* с различными типами биологической активности: фитостимулирующей, пробиотической, антифунгицидной, микотоксин-деградирующей и др. Выбранный автором подход представляется логичным: воздействие на разные ключевые гены у представителей двух родов спорообразующих бактерий повышает универсальность выводов и позволяет оценивать как общий, так и видоспецифичный биосинтетический потенциал на разных уровнях регуляции.

Автором впервые получена и охарактеризована группа рифампицин-устойчивых мутантов разных видов *Bacillus* и *abrV*-делеционные мутанты штамма *B. amyloliquefaciens* B-1895, которые характеризуются улучшенными протекторными и противогрибковыми свойствами. Установлена связь между нарушением функции *abrV* и усилением антиоксидантной, антимуtagenной и SOS-ингибирующей активностью. Особого внимания заслуживает обнаружение антагонистической активности *de novo* у *Rif^R*-мутантов штамма C76.2, стабильно сохраняющейся при пассировании, что открывает перспективы активации скрытого биосинтетического потенциала. Впервые проведён сравнительный анализ влияния источников углерода на экспрессию гена *ssrA* и показана связь между составом питательной среды и уровнем экспрессии генов вторичного метаболизма.

В работе использованы современные молекулярно-генетические методы, включая биосенсорные тест-системы для оценки генотоксичности и окислительного стресса, иммуоферментный анализ, метод ПЦР в реальном времени, полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ. Достоверность результатов обеспечена

корректным планированием экспериментов, достаточным числом биологических повторностей и адекватной статистической обработкой.

Выводы и положения, выносимые на защиту, логично вытекают из полученных данных и согласуются с современными представлениями о регуляции вторичного метаболизма у бацилл. Вместе с тем, при сопоставлении задач и выводов обращает на себя внимание их неполное соответствие. Так, задача 3 (локализация и характер мутаций) фактически раскрыта в выводе 1, тогда как вывод 3 посвящён видовой идентификации штаммов и аннотации гена *cotA*; задача 4 (корреляция экспрессии *ssrA* и *abgV* с НРП-синтезом) трансформировалась в описание эффектов без количественной оценки корреляции в выводе 4; задача 5 завершается рекомендацией комбинации *groV* и *abgV* с оптимизацией среды, при том что совместный эффект этих факторов в работе не исследовался. Такое перераспределение материала между выводами затрудняет оценку того, насколько полно каждый из них отвечает на соответствующую задачу. Хотелось бы уточнить позицию автора по этому вопросу.

Полученные результаты расширяют представления о плеiotропных эффектах генов *groV*, *abgV* и *ssrA* и о штаммоспецифичности их проявления. Практически значимы данные о том, что *Rif^R*-мутанты могут быть основой для постбиотических препаратов, не требующих прохождения процедуры сертификации ГМО, а сведения о влиянии источников углерода — для оптимизации питательных сред. Новизна и практическая значимость работы подтверждены двумя патентами и свидетельством о государственной регистрации базы данных; результаты апробированы на пяти конференциях и опубликованы в виде 7 работ, из них 4 статьи — в изданиях перечня ВАК, Scopus, Web of Science и RSCI.

При общей положительной оценке работы возникает ряд вопросов дискуссионного характера.

1. Полученные данные демонстрируют существенную штаммоспецифичность эффектов *Rif^R*-мутаций: у одних штаммов протекторная и противогрибковая активность возрастала (KATMIRA1933, B-1895, C15, C65B), у других не изменялась (C49.1A, CL56), у третьих снижалась (C65A, CL33, CL35), а у C76.2 появлялась *de novo*. При этом в выводах сформулированы обобщающие положения о преимущественном усилении протекторной и антиоксидантной активности у *Rif^R*-мутантов и о снижении эффективности деградации микотоксинов. Чем автор объясняет такое расхождение между данными и обобщающими выводами? Насколько универсальным представляется отбор рифампицин-устойчивых мутантов как инструмент селекции? и какие факторы — локализация мутаций в *groV*, их характер (транзиции/трансверсии, кластеризация в районах I и II) или генотипические особенности штаммов?

2. В развитие предыдущего вопроса хотелось бы уточнить методику иммуноферментного анализа. В таблице 1 приведены разные единицы измерения (мкг/кг и мкг/мл), не указаны условия постановки эксперимента и не приведены данные о достоверности различий между исходным штаммом и *Rif^R*-мутантами. Кроме того, вывод о снижении эффективности деградации у всех *Rif^R*-мутантов не подтверждается для мутанта CL56: концентрация зеараленона у него практически не отличается от исходного штамма (0,307 против 0,306 мкг/мл). Почему этот результат не обсуждается в работе?

3. Автор объясняет связь между деградацией зеараленона и quorum-quenching активностью функциональным участием гена *cotA*, кодирующего лакказу с широкой субстратной специфичностью. Проводилась ли в работе проверка экспрессии этого гена или его ферментативной активности, или вывод сделан исключительно на основании наличия гена в геноме? Представляется, что этот вопрос важен, поскольку соответствующее положение является одним из ключевых в работе.

4. Какова была цель редактирования гена *abgV*, и почему для полногеномного анализа выбран только клон K15, тогда как фенотипические данные получены для всех 12 мутантов? Ряд клонов (K40, K49, K53) превосходил K15 по изученным показателям, что

делает выбор K15 для секвенирования неочевидным. На каком основании наблюдаемые фенотипические различия между клонами связываются именно с делецией в *abrB*, а не с внецелевыми (off-target) эффектами CRISPR-Cas? И как наличие остаточных 23 нуклеотидов, включая терминатор, может влиять на итоговый фенотип мутанта?

5. Оценка мутаций с плеiotропным эффектом проведена на основе анализа экспрессии генов НРП-синтеза и оценки показателей биологической активности выращиваемых культур. Такой методический подход позволяет судить о вовлеченности нерибосомального пути, но не позволяет строго разделить вклад рибосомальных и нерибосомальных метаболитов, поскольку в культуральной жидкости одновременно присутствуют продукты обоих путей, а также поликетиды, липопептиды и ферменты. Автор справедливо отмечает, что гиперпродукция метаболитов требует прямого подтверждения. В связи с этим — планируется ли верификация вклада отдельных путей, например, посредством инактивации NRPS-кластеров, использования мутантов по генам рибосомальных пептидов или биохимического фракционирования культуральной жидкости?

6. Хотелось бы также уточнить логику выбора нерибосомального синтеза в качестве основного объекта оценки. В работе охарактеризованы разные классы вторичных метаболитов, однако явного обоснования приоритета НРП не приведено. Кроме того, кластер синтеза полимиксина, как известно, характерен прежде всего для представителей *Paenibacillus* spp., тогда как для *Bacillus* spp. его наличие не является типичным. Как в этом контексте автор объясняет выбор гена *pmxE* в качестве основного маркера НРП-синтеза для штамма *B. subtilis* C65A? Не было бы более корректным использовать для этого штамма гены *srfAA*, *ituD* или *fepC*, также перечисленные в методах?

Указанные вопросы носят уточняющий характер и не снижают ценности проведенного исследования.

В заключение следует отметить, что диссертационная работа Стаценко Варвары Николаевны представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне, обладающее научной новизной, теоретической и практической значимостью. Содержание автореферата соответствует специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки). Работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по указанной специальности.

Румянцева Марина Львовна,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
заведующая лабораторией генетики и
селекции микроорганизмов №6
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

«___» _____ 2026 г.

Почтовый адрес: 196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, шоссе Подбельского, д. 3

Телефон, факс: +7 (812) 470-51-00

Электронная почта: mrourmiantseva@arriam.ru

Подпись Румянцевой Марины Львовны, ведущего научного сотрудника лаборатории №6 Генетики и селекции микроорганизмов, временно исполняющей обязанности заведующего той же лабораторией Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», кандидата биологических наук, заверяю:

начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСХМ

23.09.2026 г.

